

Involvement of mismatch repair proteins in activation-induced deaminase-mediated antibody diversification

Doctoral Thesis**Author(s):**

Schanz, Silvia

Publication date:

2008

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005710407>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 17949

INVOLVEMENT OF MISMATCH REPAIR PROTEINS IN
ACTIVATION-INDUCED DEAMINASE-MEDIATED
ANTIBODY DIVERSIFICATION

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Dr. sc. ETH Zurich

Presented by

SILVIA SCHANZ

Dipl. Biol. Universität Freiburg im Breisgau

03.04.1978

Citizen of

GERMANY

Accepted on the recommendation of

Prof. Josef Jiricny
Prof. Hans Hengartner
Prof. Ruedi Aebersold
Prof. Matthias Wabl

2008

1 SUMMARY

Antibody diversification in vertebrates is mediated by three metabolic processes: V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR). While V(D)J recombination occurs in a very early stage in the bone marrow and leads to the production of a primary repertoire of low-affinity antibodies, SHM and CSR are part of a maturation process resulting in high-affinity binding antibodies. This affinity maturation takes place in germinal centers, a special microenvironment within secondary lymphoid organs, upon activation of the B cells through antigen binding and T cell interaction. Both SHM and CSR are triggered by a single enzyme, activation-induced cytidine deaminase (AID), which deaminates cytidines in immunoglobulin gene loci and thus gives rise to U/G mispairs in DNA. AID is essential for the initiation of both SHM and CSR, but both processes are believed to be accomplished by the downstream processing of the deamination damage, rather than by AID itself. Recent genetic studies implicated base excision repair (BER) and mismatch repair (MMR) proteins in this processing. As canonical post-replicative MMR is responsible for the removal of biosynthetic errors from newly synthesized DNA, its involvement in a metabolic process leading to a high number of mutations (SHM) and double strand breaks and recombination (CSR) appears to be counterintuitive, unless the process involves a non-canonical BER and MMR, most likely in conjunction with novel interacting partners.

In order to gain new insights into the processes of SHM and CSR, we set out to search for AID interacting proteins, making use of several protein purification and interaction approaches followed by mass spectrometric analysis. While we did not observe a direct interaction between AID and MMR proteins, we identified a number of other proteins potentially interacting with AID. Among these, the helicases RuvB-like1/2 were identified and thus became a subject of further studies in the lab.

In order to investigate the interference of MMR and BER in the processing of AID-mediated U/G mispairs, we exploited an *in vitro* MMR assay system. Using heteroduplex DNA substrates containing several U/G mismatches, such as possibly arise through the processive deamination of cytosines by AID, we could show that a subset of uracil residues can act as initiation sites for MMR-dependent repair of

neighboring U/G mispairs. We furthermore showed that this uracil-directed repair is dependent on MutS α , while MutL α seems to be of minor importance.

Our data provide a novel insight into the SHM process and help explain some important genetic findings that have been puzzling the field for several years.

1.1 Zusammenfassung

Drei metabolische Prozesse sind in Vertebraten massgeblich an der Diversifizierung von Antikörpern beteiligt: V(D)J Rekombination, somatische Hypermutation (SHM) und Klassenwechsel-Rekombination ("class switch recombination", CSR). Während die V(D)J Rekombination bereits sehr früh im Knochenmark stattfindet und dadurch ein erstes Repertoire an schwach affinen Antikörpern erzeugt wird, sind SHM und CSR Schritte eines Reifeprozesses, der in hoch affinen Antikörpern resultiert. Diese Affinitätsreifung findet nach Aktivierung der B Zellen durch Antigenbindung und Interaktion mit T Zellen in Keimzentren, speziellen Mikrostrukturen innerhalb sekundärer Lymphorgane, statt. Sowohl SHM als auch CSR werden von einem einzigen Enzym initiiert, der "activation-induced cytidine deaminase" (AID), welches Cytidine innerhalb von Immunoglobulin (Ig) Genloci deaminiert und folglich U/G Fehlpaarungen in der DNA generiert. Obwohl AID sowohl für die Initiation von SHM als auch von CSR essentiell ist, sind auch die nachfolgend („downstream“) agierenden Proteine für die Prozessierung des Deaminationschadens massgeblich. Die Ergebnisse genetischer Studien ergaben kürzlich Hinweise auf eine Beteiligung zweier Reparaturmechanismen, "base excision repair" (BER) und "mismatch repair" (MMR) an SHM und CSR. Die konventionelle "Mismatch"-Reparatur ist verantwortlich für die Behebung von biosynthetischen Schäden in neu-synthetisierter DNA. Eine Beteiligung dieses Reparaturweges an einem metabolischen Prozess, der einerseits eine grosse Anzahl an Mutationen einführt (SHM) und andererseits zu Doppelstrangbrüchen und Rekombination (CSR) führt, erscheint deshalb nicht eingängig. Es sei denn der Prozess involviert BER und MMR Mechanismen, die auf neue Interaktionspartner zurückgreifen und damit nicht der Norm entsprechen.

Um neue Erkenntnisse über SHM und CSR zu gewinnen, haben wir uns in der vorliegenden Arbeit mit der Suche nach neuen Interaktionspartnern von AID

beschäftigt. Zur Anwendung kamen dabei unterschiedliche Proteinreinigungsprotokolle und Interaktionsstudien-Ansätze, gefolgt von massenspektrometrischen Analysen. Wir identifizierten eine Reihe neuer, potentieller Interaktionspartner von AID, wobei direkte Interaktionen zwischen AID und MMR-Proteinen nicht beobachtet werden konnten. Unter den identifizierten Proteinen waren unter anderen die Helikasen RuvB-like1 und 2, welche daraufhin genauer untersucht wurden.

Um das Zusammenspiel zwischen MMR und BER bei der Prozessierung von AID-generierten U/G Fehlpaarungen genauer zu untersuchen, machten wir uns ein *in vitro* “MMR-Assay” System zu Nutze. Durch die prozessive Deamination durch AID entstehen mehrere U/G Fehlpaarungen im Ig Locus. Durch Einsatz eines DNA Substrates, das zwei solcher Fehlpaarungen enthält, konnten wir zeigen, dass einzelne Uracile als Eintrittsstelle für eine MMR-abhängige Reparatur benachbarter U/G Basenpaare fungieren können. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass diese von Uracil initiierte Reparatur abhängig ist von MutS α , wohingegen MutL α von geringerer Bedeutung ist.

Unsere Ergebnisse liefern damit neue Einblicke in den Prozess der SHM und helfen bedeutende genetische Studien zu deuten, die das AID-Gebiet seit mehreren Jahren beschäftigen.